

新しい抗 Fas モノクローナル抗体による 治療薬開発への試み

芹澤 伸 記

要 旨

細胞障害活性を有する抗ヒト Fas 抗体は、活性化 T 細胞や慢性関節リウマチ由来の異常増殖滑膜細胞の除去作用を有する自己免疫疾患に対する根本的な治療薬として期待されている。しかし、今まで知られている抗 Fas 抗体は、肝細胞に対してもアポトーシスを有するため治療薬としての開発は難しい。我々は、肝毒性を示さない新規抗 Fas 抗体の取得を試み、その取得に成功した。さらに、遺伝子工学的手法により抗体のヒト化に成功し、抗体医薬としての可能性を見いだした。

はじめに

米原らは、ヒトの 2 倍体線維芽腫である FS-7 細胞を BALB/c マウスに免疫した後、そのマウス脾細胞をマウス骨髓腫細胞株 NS-1 と融合させ、得られた融合細胞の 1 つに細胞障害活性を持つモノクローナル抗体を産生するものがあり、CH-11 と名付けて 1989 年に報告した¹⁾。この抗体の発見とその後の驚異的な研究の進展により、アポトーシスに関する Fas/FasL の全体像がある程度明らかになってきた。

さらに近年、*lpr* や *gld* マウスの異常から、Fas/FasL システムが機能しないことにより、T 細胞の異常増殖や自己免疫疾患が引き起こ

されることが明らかとなった。すなわち、自己反応性 T 細胞は Fas/FasL のシステムによって除去できると予想された。米原らは、FasL 遺伝子の突然変異体であり、自己免疫疾患のモデルマウスである *gld* マウスに対して、抗マウス Fas 抗体 RK-8 を投与することにより、著しい自己免疫疾患症状の改善効果が得られることを明らかにしている²⁾。一方自己免疫疾患の患者では、免疫担当細胞だけが問題となっているわけではなく、リウマチ患者の関節では、自己に対する免疫反応の結果として滑膜細胞の増殖による滑膜の肥厚が起これ、それが関節炎の原因の 1 つと考えられている。

以上の理由から西岡らは、米原らが見いだした抗ヒト Fas 抗体 CH-11 を用いて、慢性関節リウマチ (RA) 患者由来の滑膜細胞に Fas 分子が発現していること、*in vitro* で CH-11 処理により患者由来の滑膜細胞がア

* 三共㈱バイオメディカル研究所 研究第三室 室長

キーワード: 抗ヒト Fas 抗体,
慢性関節リウマチ由来滑膜細胞,
自己免疫疾患, 肝毒性, 抗体のヒト化

表1 これまでに報告されている抗 Fas 抗体

抗体名	タイプ	肝毒性
Jo2	ハムスター抗マウス Fas IgG	劇症肝炎を誘導
RK-8	ハムスター抗マウス Fas IgG	一過的
AP0-1	マウス抗ヒト Fas IgG3 κ	?
CH-11	マウス抗ヒト Fas IgM κ	?

略語：巻末の「今月の略語」参照

ポトシスを引き起こすことを見いだした³⁾。すなわち、細胞障害活性を有する抗 Fas 抗体は、活性化T細胞や RA 異常増殖滑膜細胞の除去作用などを有する今までの対処療法的治療薬と異なり、自己免疫疾患に対する根本的な全く新しい概念の自己免疫疾患治療薬として期待されている。しかし、抗 Fas 抗体はタイプによっては肝毒性を示し、危険なものであるという考えが定着してきている(表1)⁴⁾。しかし、抗マウス Fas 抗体である RK-8 は一過性の肝毒性を示すのみで、抗ヒト Fas 抗体の中にヒトに投与可能な抗体を創製できる可能性を示唆している。

そこで我々は、米原らと共同でヒトに対して投与可能で肝毒性を示さない抗ヒト Fas 抗体の取得を試み、新規抗ヒト Fas 抗体 HFE7A の取得に成功した。HFE7A はマウスからヒトまでの Fas に対して免疫交差性があり、さらに肝に対して毒性を全く示さず、ヒトに対して投与の可能性のあるユニークな抗体であることが明らかとなってきた。

新規抗 Fas 抗体 HFE7A の取得⁵⁾

ヒト Fas 細胞外領域と IL-3R 細胞外領域との融合タンパク質を作製し、Fas ノックアウトマウスを免疫して採取した脾臓細胞よりハイブリドーマを作製した。限界希釈法によってクローニングを実施し、得られた複数のクローンより IgG1 型の新規抗 Fas 抗体を単離した。そのうちの1つである HFE7A は、

ヒトのみならずマウスの Fas 分子に対しても反応性を示した。さらに、Fas 発現細胞株 (WR19L12a: ヒト Fas 発現, L5178YA1: マウス Fas 発現) に対し、*in vitro* で抗マウス IgG 抗体でのクロスリンク条件下、HFE7A は濃度依存的に細胞障害作用を示した。

HFE7A の免疫交差性⁶⁾

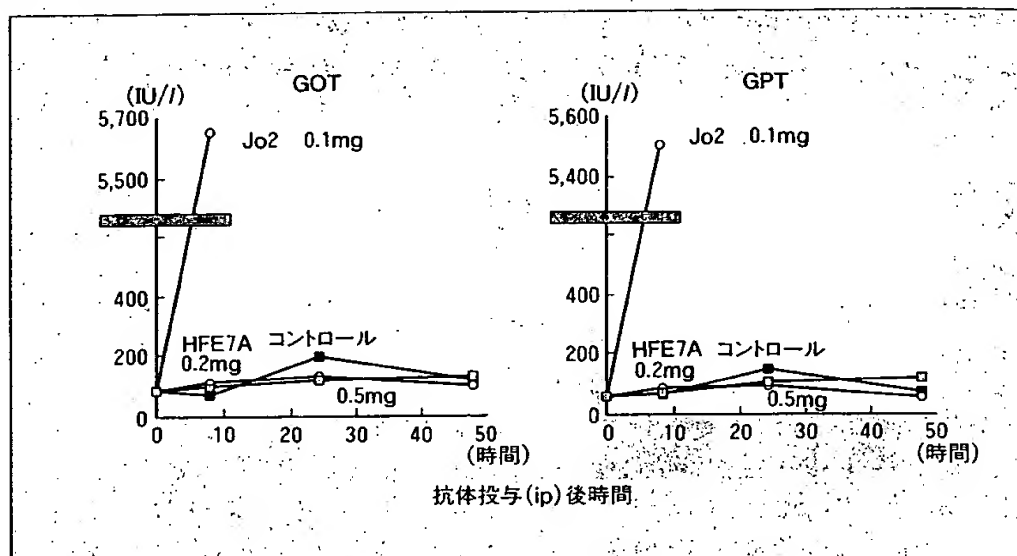
新規抗 Fas 抗体 HFE7A の各種サル、マウスに対する免疫交差性を検討した。ニホンザル、カニクイザル、マーモセット、チンパンジーおよびヒトの末梢血リンパ球を PHA と IL-2 で活性化し、HFE7A と 2 次抗体で染色しフローサイトメトリー (FCM) で解析した。HFE7A はニホンザル、カニクイザル、マーモセット、チンパンジーに対して免疫交差性を示した。BALB/c マウスに対しては交差性を示したが、他のマウスに関して交差性は認められなかった。

BALB/c マウスの Fas に対する結合能は、ヒト Fas の結合能の1/100程度と推定されるが、現在知られている抗ヒト Fas 抗体がヒト、チンパンジーにのみ免疫交差性を有しないのに比べて、BALB/c マウスなどの実験動物で評価できるので、抗ヒト Fas 抗体を薬剤として開発していくときに有利である。

肝毒性を示さない抗 Fas 抗体としての HFE7A⁵⁾

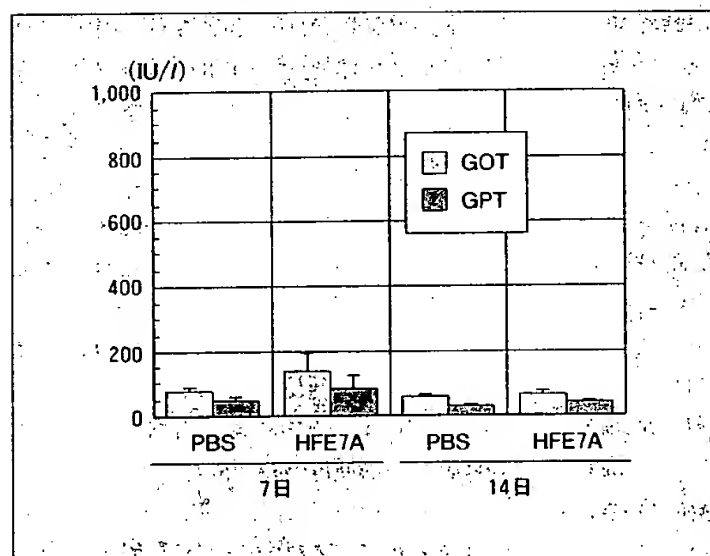
HFE7A の最大の特徴は、今まで知られて

図1 HFE7A の単回投与時の GOT, GPT 値



略語: 巻末の「今月の略語」参照

図2 HFE7A の連投時の GOT, GPT 値

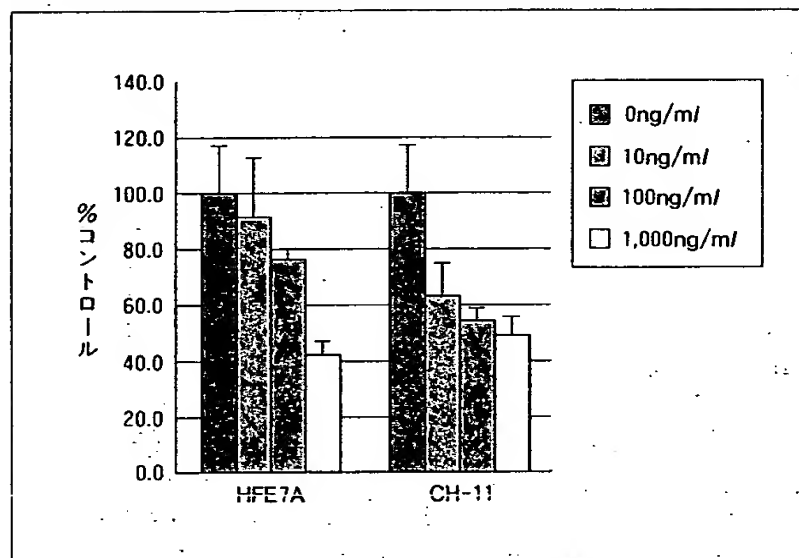


略語: 巻末の「今月の略語」参照

いる抗 Fas 抗体と異なって肝臓に対して毒性を全く示さないことである。BALB/c マウスに対し、HFE7A (0.2mg, ip) を単回、および1および2週間連投しても、GOT, GPT 値および肝組織像に全く変化は認められなかった (図1・2)。

興味深いことに、BALB/c マウスに劇症肝炎を誘発することが知られている Jo2 (100 μ g, ip) を投与し、同時に HFE7A (100 μ g, ip) を投与することにより、劇症肝炎の発症を阻害した。HFE7A は、肝臓ではむしろアポトーシスを抑制するものと推察さ

図3 HFE7A の慢性関節リウマチ (RA) 滑膜細胞に対するアポトーシス誘導能 (その1例として RA 312)



れている。

さらに毒性試験として、霊長類であるマーモセットに HFE7A を 2mg/body 静脈内投与し、24 時間後解剖して調べたが、GOT, GPT をはじめとする肝機能に変化は認められず、病理的検査からも毒性は認められていない。また、BALB/c に抗マウス Fas 抗体 RK-8 を投与すると、投与 1 日目に Gr1 陽性細胞が減少し、4～7 日目に反動で激増するが⁷⁾、HFE7A においてはそのような作用も認められなかった。

今後は、マーモセットより、よりヒトに近いカニクイザル、チンパンジーでの毒性試験を実施し、安全性を確認した後、ヒト化抗 Fas 抗体 HFE7A によるヒトでの検討を実施していく予定である。

HFE7A のアポトーシス誘導能

1. Fas 発現細胞および慢性関節リウマチ (RA) 患者由来滑膜細胞に対するアポトーシス誘導能 (*in vitro*)⁹⁾

新規抗 Fas 抗体 HFE7A の *in vitro* アポトーシス誘導活性は、前述したように Fas

発現細胞株に対して *in vitro* で抗マウス IgG 抗体でのクロスリンク条件下、濃度依存的に細胞障害作用を示した。さらに、HFE7A の医薬としての開発の主目的である RA に対する治療効果を検討する第 1 段階として、RA 患者由来滑膜培養細胞に対するアポトーシス誘導能を XTT 法で検討した。その結果、RA 滑膜培養細胞に HFE7A を添加すると、3 例中 2 例においてアポトーシス誘導が観察された (図 3)。

このように、HFE7A は RA 患者由来の異常増殖滑膜細胞に対してアポトーシス誘導能を有しており、治療応用の可能性が考えられ、臨床応用への期待が持たれた。

2. *in vivo* でのアポトーシス誘導能

1) 自然発症自己免疫疾患モデル動物 (*gld/gld* マウス)

FasL 遺伝子の突然変異がある自己免疫疾患のモデルマウスである *gld* マウスに対して、HFE7A を投与することによって自己免疫疾患症状が改善された。すなわち、9 週齢の全身性エリテマトーデス様自己免疫疾患のモデ

ルマウスである *MRLgld/gld* マウスに、HFE7A (0.2あるいは0.5mg, ip) 単回, あるいは1週間に1回連投しても, 50日後に自己免疫疾患によって生じる手首および足首の腫れを観察したところ, これらの症状が改善された。またこれらの HFE7A 投与マウスから胸腺を摘出し, T細胞の割合を調べた結果, Fas 発現T細胞数は減少していた。

2) BALB/c マウス⁹⁾

BALB/c マウスに対する *in vivo* 効果を検討した。マウスに HFE7A を静脈内投与し, TUNEL 法によりアポトーシス細胞を検出した。また, 胸腺細胞中のヒト Fas 陽性細胞の割合を FCM で解析した。

BALB/c マウスに HFE7A を投与すると, 胸腺中に TUNEL 陽性細胞が観察された。また, ヒト Fas トランスジェニックマウスを作製し, HFE7A を投与したところ, 胸腺中のヒト Fas 陽性細胞の割合が減少した。

以上のことから, HFE7A は *in vivo* においてもアポトーシス誘導活性を示すと考えられた。HFE7A は *in vitro* では2次抗体によるクロスリンクを必要とするが, *in vivo* においては単独の投与でアポトーシスを誘導する。このことから, *in vivo* においてはFc受容体を発現する細胞がクロスリンクの役割を果たしている可能性が考えられる。

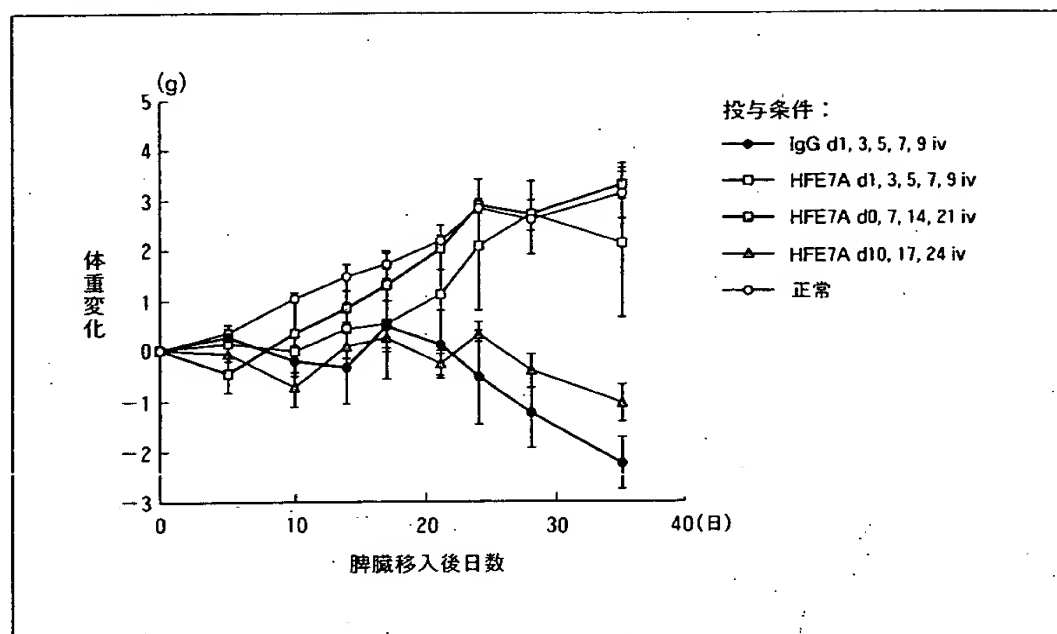
3) 移植片対宿主病 (GVHD) に対する投与効果⁹⁾

HFE7A が *in vivo* でアポトーシス誘導活性を示したことから, GVHD に及ぼす新規抗 Fas 抗体 HFE7A 投与の効果を検討した。マウス *Ick* プロモーター支配下にヒト Fas を発現させたトランスジェニックマウス (H-2^{b/b}) の脾臓細胞を SCID マウス (H-2^{d/d}) に移入し, 体重減少, 皮膚障害, 生存日数を観察した。

この系では, トランスジェニックマウスの H-2b のリンパ球が SCID マウスの H-2d の

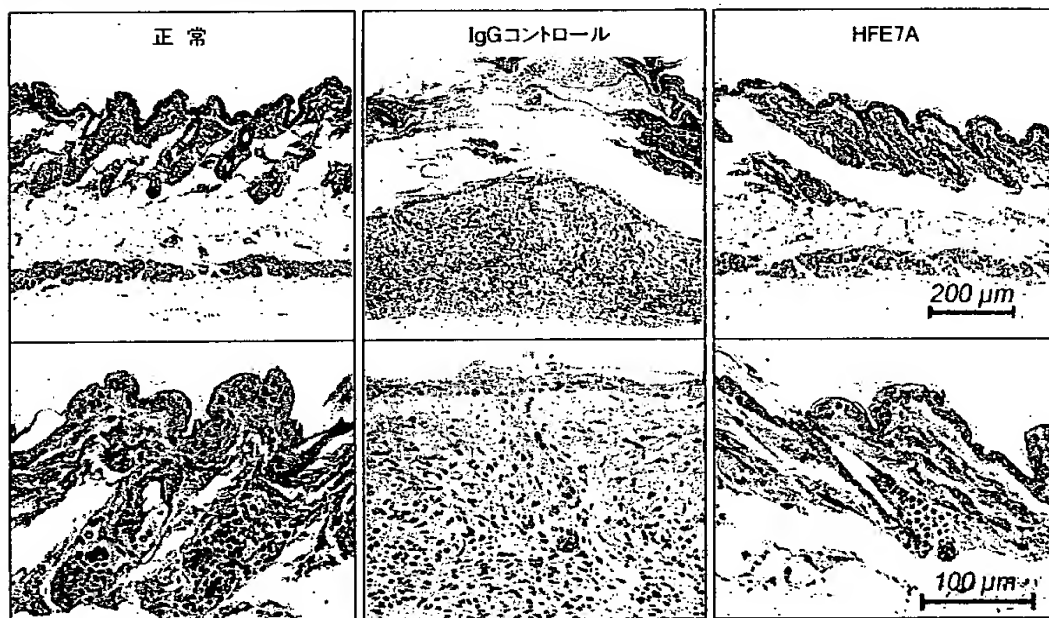
細胞を攻撃する。しかし, SCID マウスはT細胞およびB細胞がないため攻撃できず, 体重減少や皮膚症状などの GVHD が起きる。この系において, GVHD のコントロールマウスでは脾臓移入10日から14日目の体重減少と一時的な回復, それに続く継続的な体重減少という二相性の体重減少を示すが, HFE7A を初期から投与しておくで体重減少の抑制が阻止された (図4)。また, 脾臓移入30日目前後から脱毛や発赤, ただれを伴う皮膚症状を発症するが, HFE7A の投与によりほぼ完全に皮膚症状の発症が抑制された。病理組織的解析からも, GVHD を発症したマウスでは皮膚表面構造の欠失と真皮部分への好中球の浸潤が認められた。この GVHD による皮膚表面構造の欠失等は, HFE7A の投与によって改善された (図5)。作用メカニズムを解明するため, 移入後10日目の脾臓とリンパ節細胞を調べると, GVHD によって腫脹する脾臓は HFE7A 投与により変化が認められなかったが, リンパ節細胞数は半減した。FCM で解析すると, GVHD を起こすことによってリンパ節細胞の約半数がヒト Fas を発現しており, HFE7A 投与によってこれが激減していた。また, トランスジェニックマウスと同じ H-2b である C57BL/6 の移入によって起こる体重減少は, HFE7A の投与では阻害されず, HFE7A の作用がヒト Fas を介していることが示された。したがってこの SCID-GVHD モデルにおいては, ヒト Fas を発現するトランスジェニックマウス由来グラフト細胞が, 何らかの死の受容体 (death receptor) やパーフォリン経路を介して SCID 由来宿主細胞を攻撃し GVHD を起こすが, HFE7A 投与によってヒト Fas 発現細胞がアポトーシスにより死滅し, GVHD が抑制されると考えられた。

図4 体重減少に対する HFE7A の効果



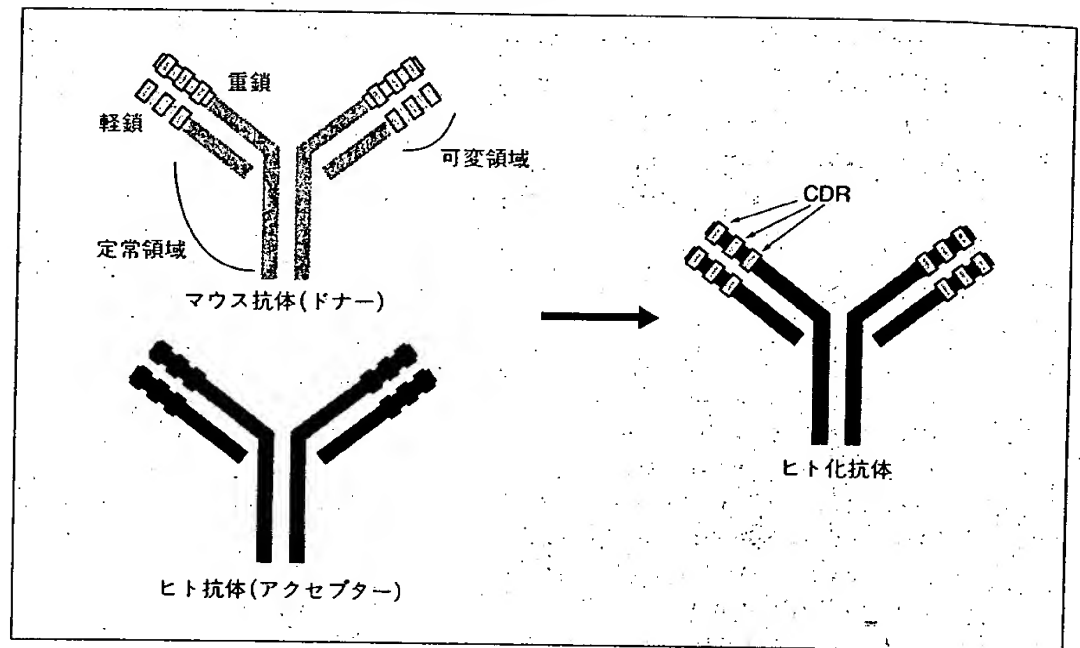
IgG: 免疫グロブリンG

図5 皮膚障害に対する HFE7A の効果



IgG: 免疫グロブリンG

図6 相補性決定領域 (CDR) 移植法による抗体のヒト化

HFE7A のヒト化^{10,11)}

遺伝子工学の進展によってヒト化抗体の作製が可能となり、生物製剤としての抗体医薬の重要性が増してきている。我々は HFE7A を抗体医薬として開発すべく、ヒト化を実施した。

まず、HFE7A を産生するハイブリドーマより重鎖および軽鎖の cDNA クローニングを行った。これらを発現ベクターに組み込み COS 細胞で発現させたところ、ヒト Fas に対する結合とアポトーシス誘導活性が認められ、HFE7A の cDNA が得られたことが確かめられた。

ヒト化には、Fc 部分のみをヒト IgG と置き換えるキメラ抗体と、抗原結合部位である相補性決定領域 (CDR) を移植する方法がある。キメラ抗体ではマウス部分が多く、これに対する抗体ができてその効果が減弱する。CDR のみを移植する場合は、抗原結合能が低下する場合がある。そこで、CDR 部分と

その立体構造を支えるフレームワーク部分の一部のアミノ酸残基を同時に移植する CDR 移植改変法によった (図6)¹²⁾。比較的相同性が高かったヒト IgG である 8E10 をアクセプターとし、3次構造のモデリングよりフレームワークで残したほうが良いアミノ酸残基を想定し、デザインを行った。重鎖で1種類、軽鎖で3種類をデザインし、これらの組合わせ3種類 (α , β , γ) を COS 細胞で発現させ、そのヒト Fas に対する結合能、ヒト Fas と HFE7A の結合阻害能、ヒト Fas 発現細胞に対するアポトーシス誘導能を検討したところ、すべてマウス型 HFE7A と同等の活性を示し、HFE7A のヒト化に成功した。

今後、これらヒト化 HFE7A の遺伝子を恒常的に発現させる細胞株を取得後、HFE7A の大量生産系を確立し、究極の目標であるヒトの RA をはじめとした自己免疫疾患の治療薬としての開発を目指していく。

ま と め

新規抗ヒト Fas 抗体 HFE7A は、マーマセットをはじめとした霊長類での安全性を確認後、Fas/FasL の異常に起因する RA をはじめとした各種自己免疫疾患に対する薬効を検討し、全く新しい概念の医薬品として開発していく。

文 献

- 1) Yonehara S, et al: A cell-killing monoclonal anti-body (anti-Fas) to cell surface antigen co-down-regulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169: 1747-1756, 1989.
- 2) Nishimura Y, et al: In vivo analysis of Fas antigen-mediated apoptosis: effects of agonistic anti-mouse Fas mAb on thymus, spleen and liver. *Int Immunol* 9 (2): 307-316, 1997.
- 3) Nakajima Y, et al: Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum* 38: 485-491, 1995.
- 4) Nagata S: Apoptosis by death factor. *Cell* 88 (3): 355-365, 1997.
- 5) 市川公久, 他: 肝毒性を示さない新規抗 Fas 抗体 HFE7A 第一報. 取得, およびその生化学的解析. *日免会学術記録* 28: 292, 1998.
- 6) 小川幸恵, 他: 肝毒性を示さない新規抗 Fas 抗体 HFE7A 第三報. 免疫交差性と in vitro 誘導効果. *日免会学術記録* 28: 293, 1998.
- 7) 稲沢裕子, 他: 抗 Fas 抗体投与によるマウス骨髄でのアポトーシスの誘導. *日免会学術記録* 28: 233, 1998.
- 8) 大槻昌彦, 他: 肝毒性を示さない新規抗 Fas 抗体 HFE7A 第二報. in vitro アポトーシス誘導効果. *日免会学術記録* 28: 293, 1998.
- 9) 桑原治美, 他: 肝毒性を示さない新規抗 Fas 抗体 HFE7A 第四報. 移植片対宿主病 (GVHD) に対する投与効果. *日免会学術記録* 28: 293, 1998.
- 10) 春山英幸, 他: 肝毒性を示さない新規抗 Fas 抗体 HFE7A 第五報. ヒト化 (設計). *日免会学術記録* 28: 294, 1998.
- 11) 高橋 亘, 他: 肝毒性を示さない新規抗 Fas 抗体 HFE7A 第六報. マウスモノクローナル抗体 HFE7A のヒト化. *日免会学術記録* 28: 233, 1998.
- 12) Queen CL, et al: A humanized antibody that binds to the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 10029-10033, 1989.

Trials on the Development of Drug by an Novel Anti-Fas Monoclonal Antibody

Nobufusa Serizawa

Biomedical Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.

Serizawa N. "Trials on the development of drug by an novel anti-Fas monoclonal antibody", Saishin-igaku, 1999, Vol.54, No.4, p917-924

p924, left column line 1-7

After we confirm safety of this novel humanized anti-Fas monoclonal antibody by using primates that includes a marmoset, we will study medicinal effect for various autoimmune diseases including rheumatism, caused by disorder of Fas/FasL. We will try to develop novel medicine based on completely new concepts.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Trials in the Development of a Novel Anti-Fas Monoclonal Antibody Drug

Nobufusa Serizawa

Biomedical Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.

Abstract

Anti-human Fas antibody, which exhibits cytotoxicity, is expected as a primordial therapeutic agent for autoimmune diseases, since the antibody exerts removing activity of activated T cells and abnormally proliferated synovial cells associated with rheumatoid arthritis. However, known anti-Fas antibodies are difficult to develop as therapeutic agents, because they induce apoptosis in hepatic cells. Thus we attempted and succeeded to obtain a novel anti-Fas antibody without hepatotoxicity. Furthermore, we also succeeded in humanization of the anti-Fas antibody using gene-engineering techniques. It may be possible to develop this anti-Fas antibody as a novel therapeutic agent.

Introduction

In 1989, Yonehara et al. reported that after immunization of diploid fibroblast FS-7 to BALB/c mice, the spleen cells were fused with myeloma cell line NS-1 and resulting in a cell line producing a monoclonal antibody that exhibited cytotoxic activity, and named this antibody CH-11¹⁾. This finding, a marvelous advancement in immunology research, opened up a whole vista on Fas/FasL mediated apoptosis.

Recently, it was found that abnormal proliferation of T cells and autoimmune diseases are elicited by functional impairment of the Fas/FasL system by analysis of abnormalities produced in *lpr* and *gld* mice. Thus it was suggested that self-responsive T cells may be eliminated by the Fas/FasL system. Furthermore, Yonehara et al. demonstrated that a mouse anti-Fas antibody, RK-8 remarkably ameliorates symptoms of autoimmune diseases following injection of RK-8 to *gld* mice, a mutant mouse strain of FasL gene and an animal model of autoimmune diseases²⁾. However, in patients with rheumatoid arthritis (RA) a representative autoimmune disease, not only abnormal immunocompetent cells but also hypertrophy of the synovial membrane caused by abnormal proliferation of synovial cells as a result of the compromised immune response, are considered to be the main pathogenic mechanisms.

Nishioka et al. demonstrated that Fas molecules are expressed in synovial cells from patients with RA using anti-human Fas antibody, CH-11, discovered by Yonehara et al. Nishioka et al. also demonstrated that apoptosis is induced in synovial cells following treatment with

THIS PAGE BLANK (USPTO)

CH-11 *in vitro*³⁾. Thus anti-Fas antibody with cytotoxic activity may be expected to show potential as a fundamental therapeutic agent with a novel concept for autoimmune diseases, differing from hitherto sallopatic agents that exert eliminating activities on activated T cells and abnormally proliferated synovial cells in patients with RA. However, since some anti-Fas antibodies exhibit hepatotoxicity, these antibodies are widely believed to be risky. Nevertheless, since RK-8, an anti-mouse antibody, exhibits only temporal hepatotoxicity, a possibility is suggested that an anti-human antibody could be developed for clinical use.

We investigated the possibility of preparing a clinically applicable anti-human Fas antibody without hepatotoxicity in collaboration with Yonehara et al., and finally succeeded in obtaining HFE7A, a unique antibody that exerts wide immunological cross reactivity to both mouse and human Fas, lacks hepatotoxicity, and is expected to be clinically applicable.

Preparation of a Novel Fas Antibody, HFE7A

The extracellular region of human Fas was fused with that of IL-3R. Then Fas knockout mice were immunized with the fusion protein and hybridoma was prepared from the spleen from the immunized mice. The hybridoma was cloned by limiting dilution method and IgG-type Fas antibodies were isolated from multiple cloned hybridomas. One of these, HFE7A, bound not only to human Fas molecules but also to mouse Fas molecules. Furthermore, HFE7A exhibited cytotoxic activity to cell lines expressing Fas (WR19L12a: expressed human Fas, L5178YA1: expressed mouse Fas) in a dose-dependent manner under crosslink conditions with an anti-mouse IgG antibody *in vitro*.

Immunological Cross-Reactivity of HFE7A

Immunological cross reactivities of HFE7A with various monkeys and mice were examined. Peripheral lymphocytes from Japanese monkeys, cynomologus monkeys, marmosets, chimpanzees, and human were activated with PHA and IL-2, stained with HFE7A and the secondary antibody, and analyzed by flowcytometry (FCM). HFE7A exhibited immunological cross reactivities with Japanese monkeys, cynomologus monkeys, marmosets, and chimpanzees. Although HFE7A exhibited cross-reactivity to BALB/c mice, it did not react with other mice strains.

The binding activity to FAS of BALB/c mice was 1/100 of that to human FAS. Since others currently known anti-human FAS antibodies showed immunological cross reactivity to only human and chimpanzees, HFE7A has advantages for development as a therapeutic agent because it can be evaluated in experimental animals such as BALB/c mice.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

HFE7A as an Anti-Fas Antibody not Having Hepatotoxicity

The most remarkable property of HFE7A is that HFE7A does not exhibit hepatotoxicity, unlike other currently known anti-Fas antibodies. Single or repeated injection of HFE7A (0.2 mg/kg, i.p.) for 1 or 2 successive weeks does not cause any changes in GOT and GPT levels or liver histopathology (Fig. 1 and 2). Interestingly, fulminant hepatitis caused by Jo2 (100 microgram, i.p.) is prevented by simultaneous injection of HFE7A (100 microgram, i.p.). HFE7A is speculated to inhibit apoptosis in the liver.

As a toxicological study, marmosets were treated with HFE7A (2 mg/body, i.v.) and autopsied after 24 hours. No changes were detected in GOT and GPT levels and other liver function tests. Furthermore, no changes were detected in pathological examinations. In BALB/c mice injected with RK-8 anti-mouse antibody, the number of Gr 1 positive cells decreased on day 1 then remarkably increased on days 4-7 as a rebounded phenomenon⁷⁾. However, HFE7A did not show these effects.

We will further perform toxicological studies in cynomolgus monkeys and chimpanzees, which are genetically closer to humans. Once safety of HFE7A is confirmed in these primates, clinical trials will begin using humanized HFE7A anti-Fas antibody.

Apoptosis Inducing Activity of HFE7A

1. Apoptosis Inducing Activity to Cells Expressing Fas and Synovial Cells from Patients with Rheumatoid Arthritis (*in vitro* Studies)⁹⁾

Apoptosis-inducing-activity of HFE7A was dose-dependently shown in cell line expressed Fas under conditions crosslinked with anti-mouse IgG antibody. Furthermore, as a step for clinical evaluation of HFE7A in patients with RA, which was the main objective for development of HFE7A, apoptosis-inducing activity of HFE7A was investigated in synovial cells from patients with RA. As a result, apoptosis was induced by addition of HFE7A to cultivated synovial cells in 2 of 3 preparations from patients with RA (Fig. 3A).

Thus since HFE7A showed apoptosis-inducing-activity toward abnormally proliferated synovial cells from patients with RA, therapeutic efficacies of HFE7A may be expected in clinical trials.

2. Apoptosis-inducing Activity *in vivo*

1) Spontaneously Developed Autoimmune Disease Animal Model (gld/gld mouse)

Autoimmune disease-like symptoms of *gld* mice, an animal model of autoimmune diseases with mutant FasL gene, were remarkably ameliorated following injection of HFE7A. Namely, a single or repeated injection (once a week) of HFE7A (0.2 or 0.5 mg, i.p.) to

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9-week-old MRL gld/gld mice, an animal model of systemic lupus erythematosus-like autoimmune diseases, ameliorated enlargement of the wrists and ankles due to the autoimmune disease 50 days after injection was started. Thymocytes were isolated from these mice and the ratio of Fas-positive T cells was evaluated, with the result that the number of T cells expressing Fas was reduced.

2) BALB/c mice

Effects of HFE7A on BALB/c mice were investigated *in vivo*. Apoptotic cells were counted by TUNEL methods in BALB/c mice following intravenous injection of HFE7A. Furthermore, the ratio of Fas-positive cells in thymocytes was analyzed with FCM.

After administration of HFE7A to BALB/c mice, TUNEL-positive cells were detected in the thymocytes. In addition, the effects of administration of HFE7A were investigated in Fas transgenic mice developed in our laboratory. As a result, the ratio of human Fas-positive cells was reduced in the thymocytes.

From these results, HFE7A was considered to exhibit apoptosis-inducing activity *in vivo* as well as *in vitro*. Although HFE7A requires crosslink with second antibody *in vitro*, it induces apoptosis without crosslink *in vivo*. Thus it is considered that cells expressing Fc receptors may play a role in crosslink of HFE7A *in vivo*.

3) Effects of HFE7A injection on Graft Versus Host Disease (GVHD)

Since HFE7A exhibited apoptosis-inducing-activity *in vivo*, its effects on GVHD were investigated. Spleen cells from transgenic mice (H-2 $^{b/b}$) expressing human Fas under promotor-control of mouse lck were transfected into SCID mice (H-2 $^{d/d}$) and their body-weight decreases, dermatopathies, and mortality observed.

In this experimental system, H-2b lymphocytes of the transgenic mice attack H-2d lymphocytes. However, since SCID mice lack T and B cells, GVHD symptoms such as body-weight-decreases and dermatopathies appear in the SCID mice. In our experiments, body weight of GVHD control mice changed biphasically, *i.e.*, decreased, followed by temporary recovery and subsequent long-lasting decrease. In transgenic mice treated with HFE7A, however, the long-lasting body weight decrease was prevented (Fig. 4). Furthermore, alopecia and dermatopathies associated with erosion were observed approximately 30 days after transplantation of the spleen in the control mice. In mice treated with HFE7A, however, these dermatological symptoms were almost completely prevented. From histopathological analysis, deficits of surface structure of the skin and infiltration of neutrophils into the corium were observed in mice with GVHD. These pathological changes were prevented by HFE7A (Fig. 5).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

In order to verify the underlying mechanisms, the spleen and lymphocytes of the mice were examined on day 10 after splenocytes transfer. Although enlargement of the spleen caused by GVHD was unaltered following injection of HFEA, the number of lymphocytes was reduced to half of that in control mice. When analyzed with FCM, approximately half of cells in the lymph node expressed human Fas due to GVHD, and HFE7A reduced the number of lymphocytes that expressed human Fas. The body-weight-decrease in SCID mice caused by the transferred splenocytes of C57BL/6 mice which have the same H-2b haplotype as the transgenic mice was not prevented by the injection of HFE7A, indicating that HFE7A exhibits its beneficial effects via human Fas. Thus in the SCID-GVHD animal model, graft cells expressing human Fas from the transgenic mice attack host cells from SCID mice via death receptors or perforin pathway, producing GVHD. HFE7A was considered to kill cells expressing Fas by inducing apoptosis, resulting in suppression of GVHD.

Humanization of HFE7A

With progresses in gene technology, humanized antibody became possible, increasing the potential of utilization of antibodies as remedies. Thus we humanized HFE7A to develop this antibody as a remedy.

First of all, cDNAs of light and heavy chain were cloned from hybridoma producing HFE7A. These were injected into an expression vector to express them in COS cells. These cells exhibited both binding to human Fas and apoptosis-inducing activity. Thus we confirmed that cDNA of HFE7A was obtained.

There are 2 kinds of humanization methods: chimeric antibody, i.e. displacement of Fc region alone with human IgG; and transplantation of complementarity-determining region (CDR). Since the chimeric antibody contains more mouse regions, antibodies against the mouse region are produced and efficacy is reduced. The transplantation of CDR may, in some cases, reduce binding activity to antigen. Thus we humanized HFE7A by modified CDR transplantation methods, in which amino residues consisting of a framework region are partly transplanted simultaneously (Fig. 6)¹²⁾. 8E10 with relatively high homology with human IgG was used as acceptor, and the humanization was designed under assumption of amino acid residues remaining in a framework from 3-dimension structural modeling. One heavy chain and 3 light chains were designed, and 3 humanized HFE7A (alpha, beta, and gamma) were expressed in COS cells by their combinations. Then their binding activities to human Fas, inhibiting activity against the binding of HFE7A to human Fas, and apoptosis-inducing activity against cells expressing human Fas were investigated. As a result, all of these humanized-HFE7A exhibited efficacy as potent as mouse HFE7A. Thus we succeeded in

THIS PAGE BLANK (USPTO)

humanization of the mouse HFE7A.

We will further investigate to establish mass production of HFE7A after a cell line that constantly expresses the HFE7A gene will be prepared, and will endeavor to develop humanized HFE7A as an agent for the treatment of autoimmune diseases such as RA, which is our final goal.

Conclusion

After safety of HFE7A is confirmed in primates such as marmosets, a novel anti-human Fas antibody, HFE7A will be developed as a remedy with a new concept for various autoimmune diseases caused by abnormalities of Fas/FasL such as RA.

References

- 1) Yonehara S, et al: A cell killing monoclonal] antibody (anti-Fas) to cell surface antigen co-down-regulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* **169**: 1747-1756, 1989.
- 2) Nishimura Y, et al: In vivo analysis of Fas antigen-mediated apoptosis: effects of agonistic anti-mouse Fas mAb on thymus, spleen and liver. *Int Immunol* **9** (2): 307-316, 1997.
- 3) Nakajima Y, et al: Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum* **38**: 485-491, 1995.
- 4) Nagata S: Apoptosis by death factor. *Cell* **88** (3): 355-365, 1997.
- 5) Ichikawa K et al.: A novel Fas antibody lacking hepatotoxicity (1). Preparation and biochemical analysis. *Proceedings of the Japan. Society of Immunol.*, **28**: 292, 1998.
- 6) Ogawa Y et al, Novel anti-Fas antibody HFE7A without hepatotoxicity (3). Crosreactivity and effectiveness *in vitro*. *Proceedings of the Japan. Society of Immunol.*, **28**: 293, 1998.
- 7) Inazawa Y et al. Apoptosis-induction to murine bone marrow cells by anti-Fas antibody. *Proceedings of the Japan. Society of Immunol.*, **28**: 233, 1998.
- 8) Ohtsuki M et al. Novel anti-Fas antibody HFE7A without hepatotoxicity 2. Apoptosis induction *in vitro*. *Proceedings of the Japan. Society of Immunol.*, **28**: 293, 1998.
- 9) Kuwabara H et al. Novel anti-Fas antibody HFE7A without hepatotoxicity 4. Effect on GVHD (graft versus host disease). *Proceedings of the Japan. Society of Immunol.*, **28**: 293, 1998.
- 10) Haruyama H et al. Novel anti-Fas antibody HFE7A without hepatotoxicity 5.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- Humanization (Design). Proceedings of the Japan. Society of Immunol., **28**: 294, 1998.
- 11) Takahashi W et al. Novel anti-Fas antibody HFE7A without hepatotoxicity 6. Humanization of mouse HFE7A monoclonal antibody. Proceedings of the Japan. Society of Immunol., **28**: 233, 1998.
 - 12) Queen CL, et al: A humanized antibody that binds to the interleukin-2 receptor. Proc Natl Acad Sci USA **86**: 10029-10033, 1989.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Table 1. Known anti-Fas antibodies

Name of Antibody	Type	Hepatotoxicity
Jo2	hamster anti-mouse Fas IgG	induction of fulminant hepatic failure
RK-8	hamster anti-mouse Fas IgG	temporal hepatotoxicity
APO-1	mouse anti-human Fas IgG3κ	?
CH-11	mouse anti-human Fas IgMκ	?

Abbreviations: see "abbreviations this month" at the end of this issue.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

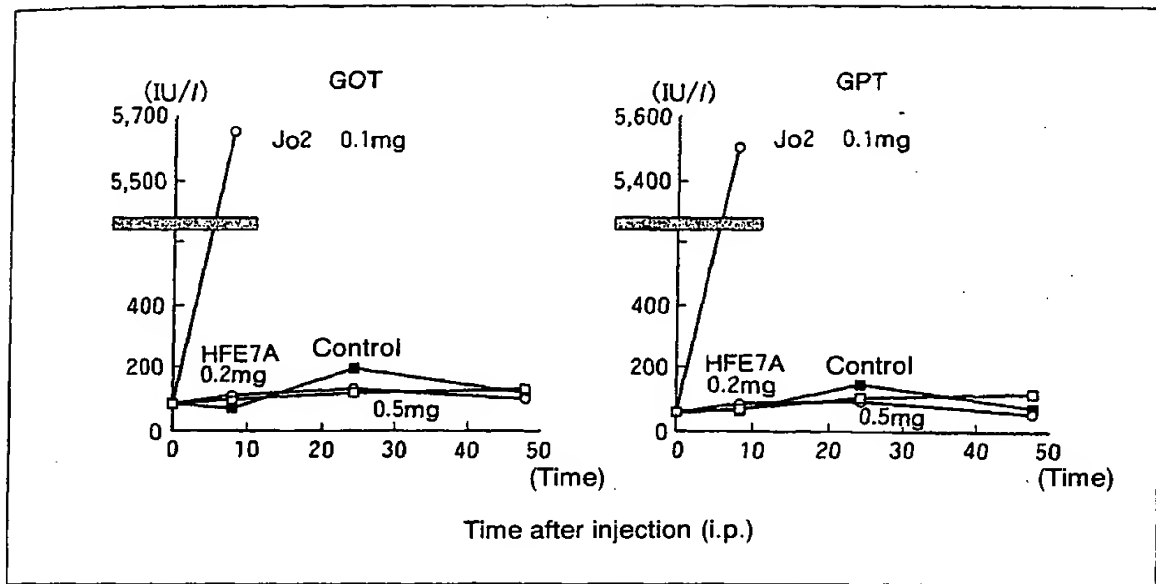


Fig. 1. GOT, GPT levels following a single injection of HFE7A.
Abbreviations: see "abbreviations in this month" at the end of this issue.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

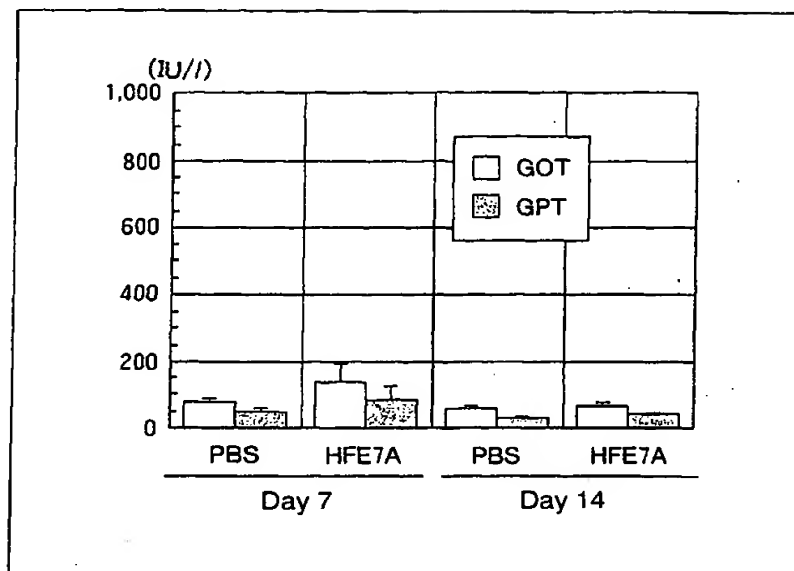


Fig. 2. GOT, GPT levels following repeated injection of HFE7A.
Abbreviations: see "abbreviations in this month" at the end of this issue.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

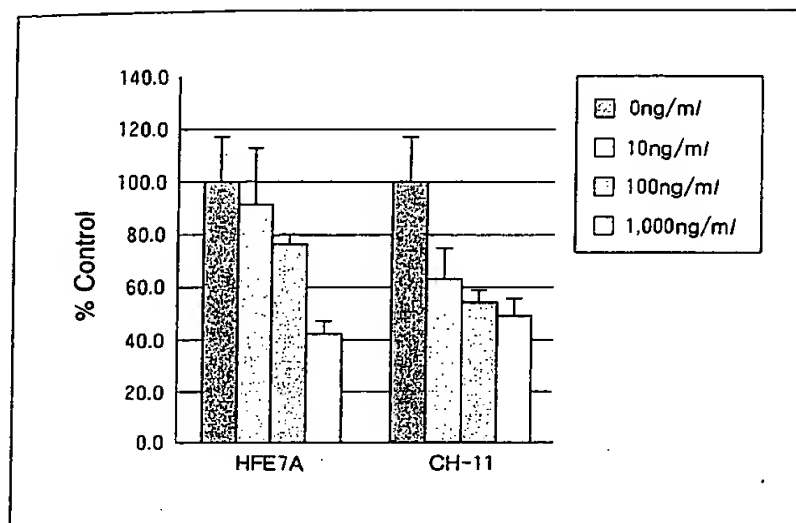


Fig. 3. Apoptosis-induction activity of HFE7A toward synovial cells from patients with rheumatoid arthritis (RA) (RA 312, as an example)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

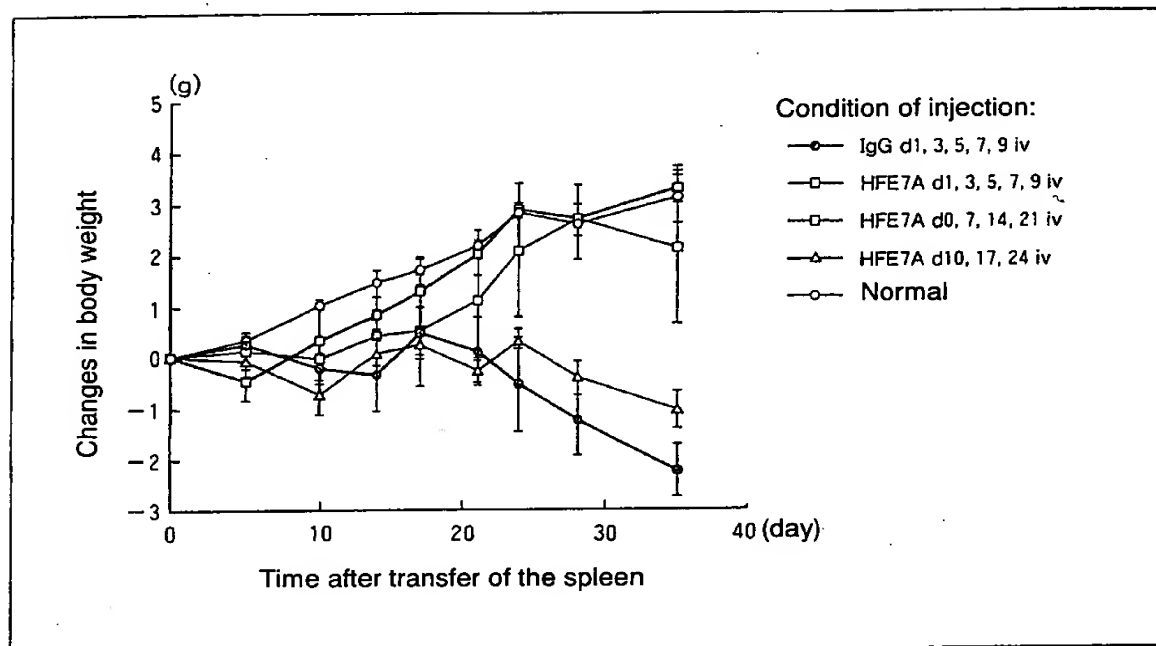


Fig. 4. Effects of HFE7A on body weight decrease
IgG: immunoglobulin G

THIS PAGE BLANK (USPTO)

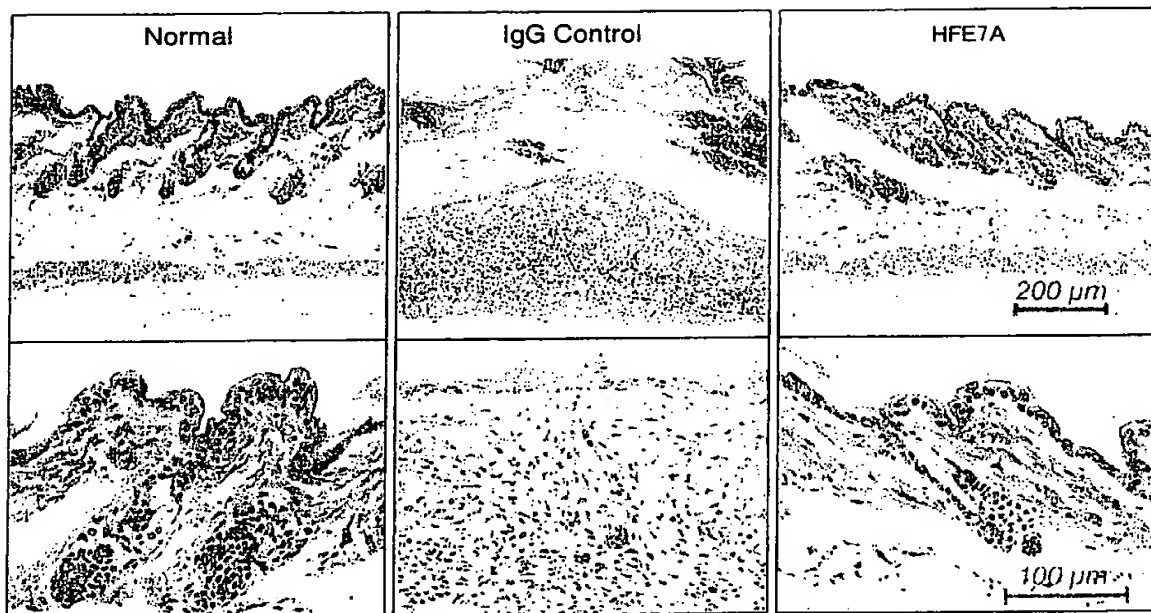


Fig. 5. Effects of HFE7A on skin impairment
IgG: immunoglobulin G

THIS PAGE BLANK (USPTO)

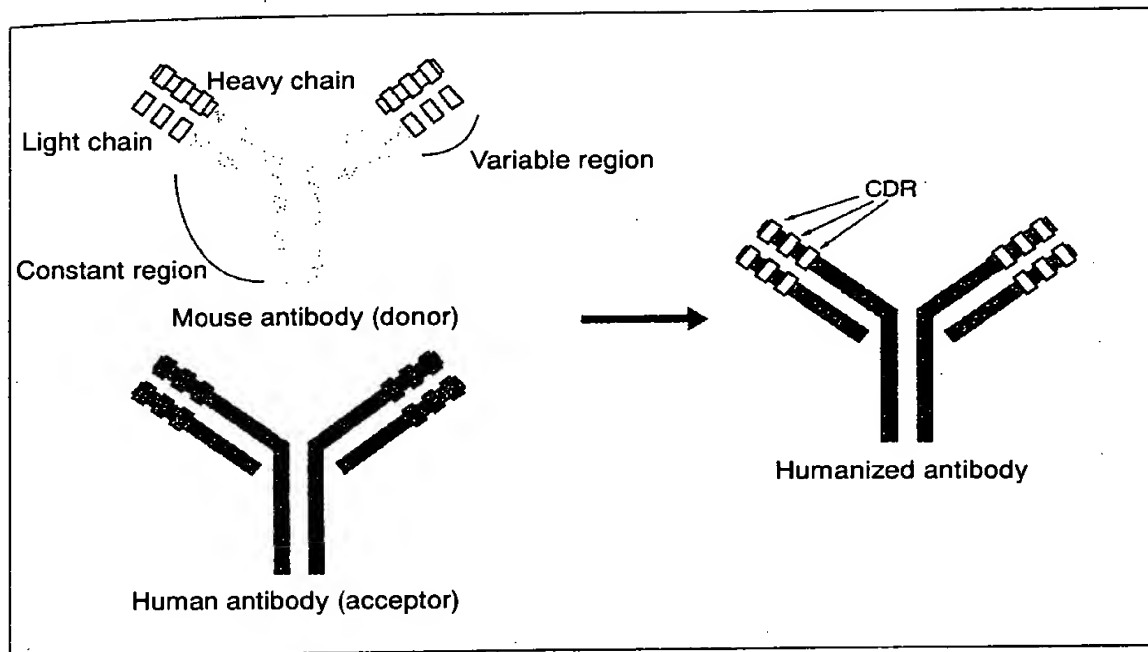


Fig. 6. Humanization of antibody by complementarity-determining region (CDR) transplantation methods

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- beta. *Biochem Biophys Res Commun* 218 (1): 280-285, 1996.
- 36) Wakisaka S, et al: Superantigen (SAg)s modulate Fas-mediated apoptotic synovial cell death in patients with rheumatoid arthritis (RA). *Arthritis Rheum* 41: s276, 1998.
- 37) Suda T, et al: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75 (6): 1169-1178, 1993.
- 38) Ozdemirli M, et al: Fas (CD95)/Fas ligand interactions regulate antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted T/B cell proliferative responses. *Eur J Immunol* 26 (2): 415-419, 1996.
- 39) Matthews N, et al: Subpopulations of primed T helper cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 36 (5): 603-607, 1993.
- 40) Kohem CL, et al: Enrichment of differentiated CD45RBdim, CD27-memory T cells in the peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39 (5): 844-854, 1996.
- 41) Salmon M, et al: Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium. *J Clin Invest* 99 (3): 439-446, 1997.
- 42) Itelling B, et al: Interleukin 2 induces apoptosis of synovial lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41: s277, 1998.
- 43) Petrow PK, et al: Expression of apoptosis-related molecules in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41: s276, 1998.
- 44) Matsuno H, et al: Treatment of RA synovitis with anti-resolving human IL-6 receptor monoclonal antibody - using a RA tissue implants in SCID mouse model - . *Arthritis Rheum* 41 (11): 2014-2021, 1998.
- 45) Ogasawara J, et al: Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364 (6440): 806-809, 1993.
- 46) Suzuki A: The dominant role of CPP32 subfamily in fas-mediated hepatitis. *Proc Soc Exp Biol Med* 217 (4): 450-454, 1998.
- 47) Kawakami A, et al: Fas and Fas ligand interaction is necessary for human osteoblast apoptosis. *J Bone Miner Res* 12 (10): 1637-1646, 1997.
- 48) Hashimoto S, et al: Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 40 (10): 1749-1755, 1997.
- 49) 市川公久, 他: 肝毒性を示さない新規抗 Fas 抗体 HFE7A. *日免疫学会抄録* 28: 292, 1998.

Apoptosis in Rheumatoid Arthritis: A New Concept of the Inflammatory Synovitis

Hiroaki Matsuno

Department of Orthopaedic Surgery, Toyama Medical & Pharmaceutical University

新しい抗 Fas モノクローナル抗体による治療薬開発への試み

芹澤 伸 記

要 旨

細胞障害活性を有する抗ヒト Fas 抗体は、活性化T細胞や慢性関節リウマチ由来の異常増殖滑膜細胞の除去作用を有する自己免疫疾患に対する根本的な治療薬として期待されている。しかし、今まで知られている抗 Fas 抗体は、肝細胞に対してもアポトーシスを有するため治療薬としての開発は難しい。我々は、肝毒性を示さない新規抗 Fas 抗体の取得を試み、その取得に成功した。さらに、遺伝子工学的手法により抗体のヒト化に成功し、抗体医薬としての可能性を見いだした。

はじめに

米原らは、ヒトの2倍体線維芽腫である FS-7 細胞を BALB/c マウスに免疫した後、そのマウス脾細胞をマウス骨髄腫細胞株 NS-1 と融合させ、得られた融合細胞の1つに細胞障害活性を持つモノクローナル抗体を産生するものがあり、CH-11 と名付けて 1989年に報告した¹⁾。この抗体の発見とその後の驚異的な研究の進展により、アポトーシスに関する Fas/FasL の全体像がある程度明らかになってきた。

さらに近年、*lpr* や *gld* マウスの異常から、Fas/FasL システムが機能しないことにより、T細胞の異常増殖や自己免疫疾患が引き起こ

されることが明らかとなった。すなわち、自己反応性T細胞は Fas/FasL システムによって除去できると予想された。米原らは、FasL 遺伝子の突然変異体であり、自己免疫疾患のモデルマウスである *gld* マウスに対して、抗マウス Fas 抗体 RK-8 を投与することにより、著しい自己免疫疾患症状の改善効果が得られることを明らかにしている²⁾。一方、自己免疫疾患の患者では、免疫担当細胞だけが問題となっているわけではなく、リウマチ患者の関節では、自己に対する免疫反応の結果として滑膜細胞の増殖による滑膜の肥厚が起こり、それが関節炎の原因の1つと考えられている。

以上の理由から西岡らは、米原が見いだした抗ヒト Fas 抗体 CH-11 を用いて、慢性関節リウマチ (RA) 患者由来の滑膜細胞に Fas 分子が発現していること、*in vitro* で CH-11 処理により患者由来の滑膜細胞がア

・ 三井物産バイオメディカル研究所 研究第三室 室長
キーワード: 抗ヒト Fas 抗体,
慢性関節リウマチ由来滑膜細胞,
自己免疫疾患, 肝毒性, 抗体のヒト化

THIS PAGE BLANK (USPTO)

表1 これまでに報告されている抗 Fas 抗体

抗体名	タイプ	肝毒性
Jo2	ハムスター抗マウス Fas IgG	劇症肝炎を誘導
RK-8	ハムスター抗マウス Fas IgG	一過的
APD-1	マウス抗ヒト Fas IgG3x	?
CH-11	マウス抗ヒト Fas IgMx	?

略語: 巻末の「今月の略語」参照

ポトシスを引き起こすことを見いだした²⁾。すなわち、細胞障害活性を有する抗 Fas 抗体は、活性化T細胞やRA 異常増殖性細胞の除去作用などを有する今までの対症療法、免疫抑制剤と異なり、自己免疫疾患に対する根本的な全く新しい概念の自己免疫疾患治療薬として期待されている。しかし、抗 Fas 抗体はタイプによっては肝毒性を示し、危険なものであるという考えが定着してきている(表1)³⁾。しかし、抗マウス Fas 抗体であるRK-8は一過性の肝毒性を示すのみで、抗ヒト Fas 抗体の中にヒトに投与可能な抗体を創製できる可能性を示唆している。

そこで我々は、米原らと共同でヒトに対し投与可能で肝毒性を示さない抗ヒト Fas 抗体の取得を試み、新規抗ヒト Fas 抗体 HFE7A の取得に成功した。HFE7A はマウスからヒトまでの Fas に対して免疫交差性があり、さらに肝に対して毒性を全く示さず、ヒトに対して投与の可能性のあるユニークな抗体であることが明らかとなってきている。

新規抗 Fas 抗体 HFE7A の報告

ヒト Fas 細胞外領域と IL-3R 細胞外領域との融合タンパク質を作製し、Fas ノックアウトマウスを免疫して採取した脾臓細胞よりハイブリドーマを作製した。限界希釈法によってクローニングを実施し、得られた複数のクローニングより IgG1 型の新規抗 Fas 抗体を単離した。そのうちの1つである HFE7A は、

ヒトのみならずマウスの Fas 分子に対しても反応性を示した。さらに、Fas 発現細胞株(WR19L12a: ヒト Fas 発現, L5178YAL: マウス Fas 発現)に対し、*in vitro* で抗マウス IgG 抗体でのクロスリンク条件下、HFE7A は濃度依存的に細胞障害作用を示した。

HFE7A の免疫交差性

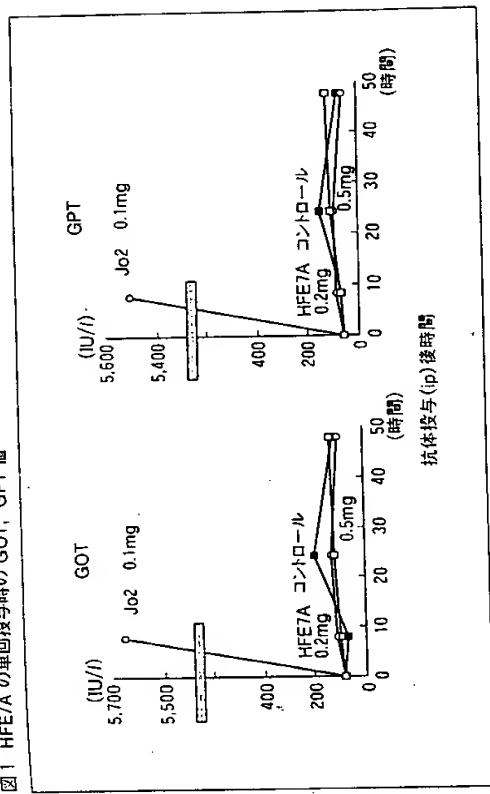
新規抗 Fas 抗体 HFE7A の各種サル、マウスに対する免疫交差性を検討した。ニホンザル、カニクイザル、マーモセット、チンパンジーおよびヒトの末梢血リンパ球を PHA と IL-2 で活性化し、HFE7A と 2 次抗体で染色しフローサイトメトリー (FCM) で解析した。HFE7A はニホンザル、カニクイザル、マーモセット、チンパンジーに対して免疫交差性を示した。BALB/c マウスに対しては交差性を示したが、他のマウスに関しては認められなかった。

BALB/c マウスの Fas に対する結合能は、ヒト Fas の結合能の1/100程度と推定されるが、現在知られている抗ヒト Fas 抗体がヒト、チンパンジーにのみ免疫交差性を有しないのに対して、BALB/c マウスなどの実験動物で評価できるので、抗ヒト Fas 抗体を薬剤として開発していくときに有利である。

東京大学医学部免疫学講座
田中 幸子、佐藤 孝、佐藤 孝、佐藤 孝

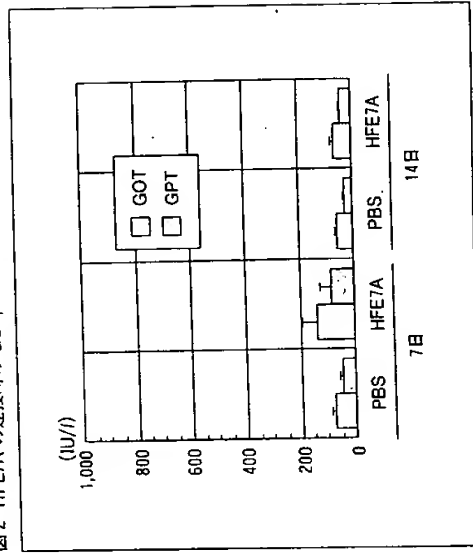
HFE7A の最大の特徴は、今まで知られて

図1 HFE7A の単回投与時の GOT, GPT 値



略語: 巻末の「今月の略語」参照

図2 HFE7A の連続投与時の GOT, GPT 値



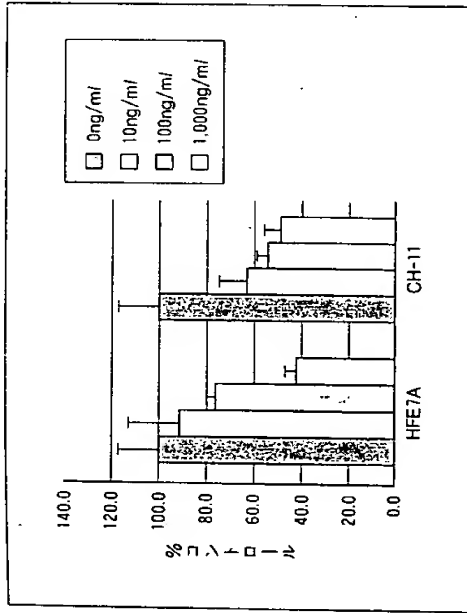
略語: 巻末の「今月の略語」参照

いる抗 Fas 抗体と異なって肝臓に対して毒性を全く示さないことである。BALB/c マウスに対し、HFE7A (0.2mg, ip) を単回、および1 および2週間連続投与しても、GOT, GPT 値および肝臓組織像に全く変化は認められなかった(図1・2)。

興味深いことに、BALB/c マウスに劇症肝炎を誘発することが知られている Jo2 (100μg, ip) を投与し、同時に HFE7A (100μg, ip) を投与することにより、劇症肝炎の発症を阻害した。HFE7A は、肝臓ではむしろアポトーシスを抑制するものと推察さ

THIS PAGE BLANK (USPTO)

図3 HFE7Aの慢性的関節リウマチ(RA)滑膜細胞に対するアポトーシス誘導能(その1例としてRA 312)



れている。

さらに毒性試験として、霊長類であるマーマセットにHFE7Aを2mg/body 静脈内投与し、24時間後解剖して調べたが、GOT、GPTをはじめとする肝機能に変化は認められず、病理的検査からも毒性は認められていない。また、BALB/cに抗マウスFas抗体RK-8を投与すると、投与1日目にGr1陽性細胞が減少し、4～7日目に反動で増殖するが、HFE7Aにおいてはそのような作用も認められなかった。

今後は、マーマセットより、よりヒトに近いカニクザル、チンパンジーでの毒性試験を実施し、安全性を確認した後、ヒト化抗Fas抗体HFE7Aによるヒトでの検討を実施していく予定である。

HFE7Aのアポトーシス誘導能

1. Fas発現細胞および慢性的関節リウマチ(RA)患者由来滑膜細胞に対するアポトーシス誘導能(*in vitro*)¹⁾
- 新規抗Fas抗体HFE7Aの*in vitro*アポトーシス誘導活性は、前述したようにFas

発現細胞株に対して*in vitro*で抗マウスIgG抗体でのクロスリンク条件下、濃度依存的に細胞障害作用を示した。さらに、HFE7Aの医薬としての開発の主目的であるRAに対する治療効果を検討する第1段階として、RA患者由来滑膜培養細胞に対するアポトーシス誘導能をXTT法で検討した。その結果、RA滑膜培養細胞にHFE7Aを添加すると、3例中2例においてアポトーシス誘導が観察された(図3)。

このように、HFE7AはRA患者由来の異常増殖滑膜細胞に対してアポトーシス誘導能を有しており、治療応用の可能性が考えられ、臨床応用への期待が持たれた。

2. *in vivo*でのアポトーシス誘導能

- 1) 自然発症自己免疫疾患モデル動物(*gld*/*gld*マウス)
- FasL遺伝子の突然変異がある自己免疫疾患のモデルマウスである*gld*マウスに対して、HFE7Aを投与することによって自己免疫疾患症状が改善された。すなわち、9週齢の全身性エリテマトーデス様自己免疫疾患のモデ

ルマウスであるMRL^{gld/gld}マウスに、HFE7A(0.2あるいは0.5mg, ip)単回、あるいは1週間に1回連投しても、50日後に自己免疫疾患によって生じる手首および足首の腫れを観察したところ、これらの症状が改善された。またこれらのHFE7A投与マウスから胸腺を摘出し、T細胞の割合を調べた結果、Fas発現T細胞数は減少していた。

2) BALB/cマウス²⁾

BALB/cマウスに対する*in vivo*効果を検討した。マウスにHFE7Aを静脈内投与し、TUNEL法によりアポトーシス細胞を検出した。また、胸腺細胞中のヒトFas陽性細胞の割合をFCMで解析した。

BALB/cマウスにHFE7Aを投与すると、胸腺中にTUNEL陽性細胞が観察された。また、ヒトFasトランスジェニックマウスを複製し、HFE7Aを投与したところ、胸腺中のヒトFas陽性細胞の割合が減少した。

以上のことから、HFE7Aは*in vivo*においてもアポトーシス誘導活性を示すと考えられた。HFE7Aは*in vitro*では2次抗体によるクロスリンクを必要とするが、*in vivo*においては単独の投与でアポトーシスを誘導する。このことから、*in vivo*においてはFc受容体を発現する細胞がクロスリンクの役割を果たしている可能性が考えられる。

3) 移植片対宿主病(GVHD)に対する投与効果³⁾

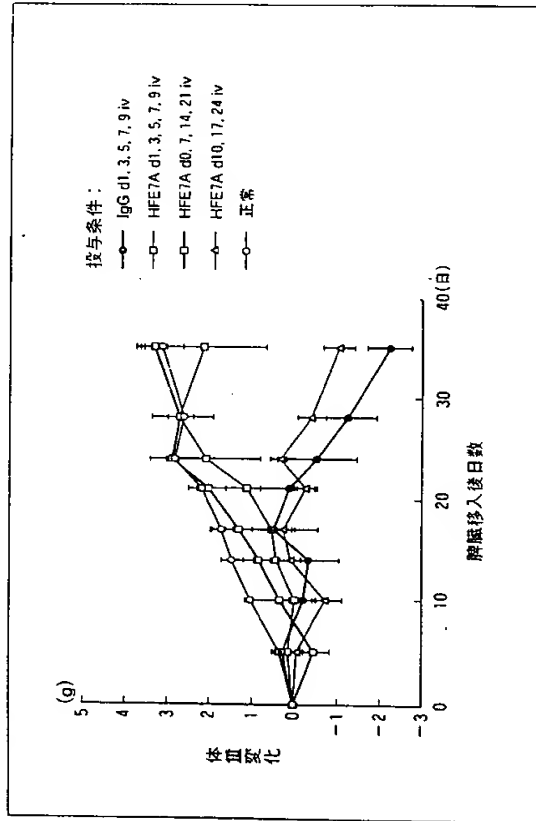
HFE7Aが*in vivo*でアポトーシス誘導活性を示したことから、GVHDに及ぼす新規抗Fas抗体HFE7A投与の効果を検討した。マウス^{1ck}プロモーター支配下にヒトFasを発現させたトランスジェニックマウス(H-2^m)の胸腺細胞をSCIDマウス(H-2^m)に移入し、体重減少、皮膚障害、生存日数を観察した。

この系では、トランスジェニックマウスのH-2bのリンパ球がSCIDマウスのH-2dの

細胞を攻撃する。しかし、SCIDマウスはT細胞およびB細胞がないため攻撃できず、体重減少や皮膚症状などのGVHDが起きる。この系において、GVHDのコントロールマウスでは胸腺移入10日から14日目の体重減少と一時的な回復、それに続く継続的な体重減少という二相性の体重減少を示すが、HFE7Aを初期から投与すると体重減少の抑制が阻止された(図4)。また、胸腺移入30日目前後から脱毛や発赤、ただれを伴う皮膚症状を発症するが、HFE7Aの投与によりほぼ完全に皮膚症状の発症が抑制された。病理組織的解析からも、GVHDを発症したマウスでは皮膚表面構造の欠失と真皮部分への好中球の浸潤が認められた。このGVHDによる皮膚表面構造の欠失等は、HFE7Aの投与によって改善された(図5)。作用メカニズムを解明するため、移入後10日目の脾臓とリンパ節細胞を調べると、GVHDによって腫脹する脾臓はHFE7A投与により変化が認められなかったが、リンパ節細胞数は半減した。FCMで解析すると、GVHDを起こすことによってリンパ節細胞の約半数がヒトFasを発現しており、HFE7A投与によってこれが激減していた。また、トランスジェニックマウスと同じH-2bであるC57BL/6の移入によって起こる体重減少は、HFE7Aの投与では阻害されず、HFE7Aの作用がヒトFasを介していることが示された。したがってこのSCID-GVHDモデルにおいては、ヒトFasを発現するトランスジェニックマウス由来グラフト細胞が、何らかの死の受容体(death receptor)やバクテリオリン経路を介してSCID由来宿主細胞を攻撃しGVHDを引き起こすが、HFE7A投与によってヒトFas発現細胞がアポトーシスにより死滅し、GVHDが抑制されると考えられた。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

図4 体重減少に対する HFE7A の効果



IgG: 免疫グロブリン G

図5 皮膚障害に対する HFE7A の効果

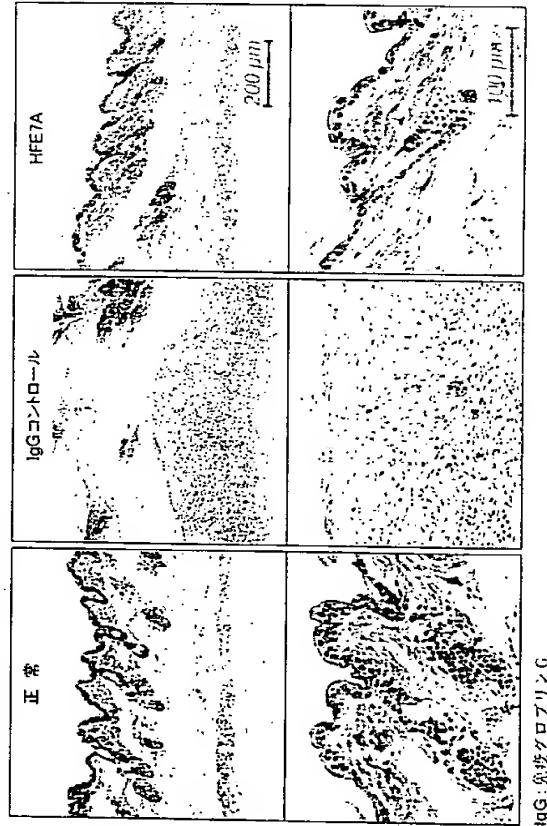
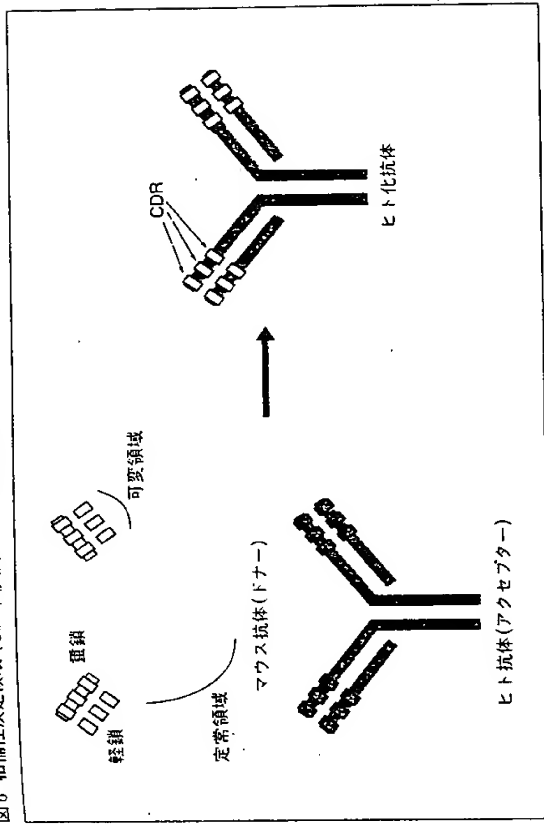


図6 相補性決定領域 (CDR) 移植法による抗体のヒト化



その立体構造を支えるフレームワーク部分の一部のアミノ酸残基を同時に移植する CDR 移植改変法によった (図6)¹⁷⁾。比較的相向性が高かったヒト IgG である 8E10 をアクセプターとし、3 次構造のモデリングよりフレームワークで残したほうが良いアミノ酸残基を想定し、デザインを行った。重鎖で 1 種類、軽鎖で 3 種類をデザインし、これらの組合せ 3 種類 (α , β , γ) を COS 細胞で発現させ、そのヒト Fas に対する結合能、ヒト Fas と HFE7A の結合阻害能、ヒト Fas 発現細胞に対するアポトーシス誘導能を検討したところ、すべてマウス型 HFE7A と同等の活性を示し、HFE7A のヒト化に成功した。

今後、これらヒト化 HFE7A の遺伝子を恒常的に発現させる細胞株を取得後、HFE7A の大量生産系を確立し、究極の目標であるヒトの RA をはじめとした自己免疫疾患の治療薬としての開発を目指していく。

HFE7A のヒト化

遺伝子工学の進展によってヒト化抗体の作製が可能となり、生物製剤としての抗体医薬の重要性が増してきている。我々は HFE7A を抗体医薬として開発すべく、ヒト化を実施した。

まず、HFE7A を産生するハイブリドーマより重鎖および軽鎖の cDNA クローニングを行った。これらが発現ベクターに組み込み COS 細胞で発現させたところ、ヒト Fas に対する結合とアポトーシス誘導活性が認められ、HFE7A の cDNA が得られたことが確かめられた。

ヒト化には、Fc 部分のみをヒト IgG と置き換えるキメラ抗体と、抗原結合部位である相補性決定領域 (CDR) を移植する方法がある。キメラ抗体ではマウス部分が多く、これに対する抗体ができてその効果が減弱する。CDR のみを移植する場合は、抗原結合能が低下する場合がある。そこで、CDR 部分と

THIS PAGE BLANK (USPTO)

新規抗ヒト Fas 抗体 HFE7A は、マウモセットをはじめとした霊長類での安全性を確認後、Fas/FasL の異常に起因する RA をはじめとした各種自己免疫疾患に対する薬効を検討し、全く新しい概念の医薬品として開発していく。

文 献

- 1) Yonehara S. et al: A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to cell surface antigen co-down-regulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169: 1747-1756, 1989.
- 2) Nishimura Y. et al: In vivo analysis of Fas antigen-mediated apoptosis: effects of neonatal anti-mouse Fas mAb on thymus, spleen and liver. *Int Immunol* 9 (2): 307-316, 1997.
- 3) Nakajima Y. et al: Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synovocytes. *Arthritis Rheum* 38: 485-491, 1995.
- 4) Nagata S: Apoptosis by death factor. *Cell* 88 (3): 355-365, 1997.
- 5) 市川公久, 他: 肝毒性を示さない新規抗 Fas 抗体 HFE7A 第一報, 取得, およびその生化学的解析. *日免会学術記録* 28: 292, 1998.
- 6) 小川幸恵, 他: 肝毒性を示さない新規抗 Fas 抗体 HFE7A 第三報, 免疫交差性と in vitro 誘導効果. *日免会学術記録* 28: 293, 1998.
- 7) 桶沢裕子, 他: 抗 Fas 抗体投与によるマウス腎臓でのアポトーシスの誘導. *日免会学術記録* 28: 233, 1998.
- 8) 大槻昌彦, 他: 肝毒性を示さない新規抗 Fas 抗体 HFE7A 第二報, in vitro アポトーシス誘導効果. *日免会学術記録* 28: 293, 1998.
- 9) 桑原治英, 他: 肝毒性を示さない新規抗 Fas 抗体 HFE7A 第四報, 移植片対宿主病 (GVHD) に対する投与効果. *日免会学術記録* 28: 293, 1998.
- 10) 春山英幸, 他: 肝毒性を示さない新規抗 Fas 抗体 HFE7A 第五報, ヒト化 (検討). *日免会学術記録* 28: 294, 1998.
- 11) 高橋 亘, 他: 肝毒性を示さない新規抗 Fas 抗体 HFE7A 第六報, マウスモノクローナル抗体 HFE7A のヒト化. *日免会学術記録* 28: 233, 1998.
- 12) Queen C.L. et al: A humanized antibody that binds to the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 10029-10033, 1989.

Trials on the Development of Drug by an Novel Anti-Fas Monoclonal Antibody

Nobufusa Serizawa
Biomedical Research Laboratories, Sanryo Co., Ltd.

AIDS とアポトーシス

—HIV 感染と T 細胞死誘導についての最近の話題と課題—

小柳津 直樹*

要 旨

HIV は CD4⁺ T 細胞にアポトーシスの機序を介した直接的細胞死を誘導する。しかしながら患者材料での解析では、CD8⁺ T 細胞を含め非感染細胞のアポトーシスが主体を占める。個体レベルでは、その直接機序に加え間接性アポトーシス誘導機序が作動していると考えられる。間接機序の主体は、感染の遅延に伴う活性化誘導細胞死の反復であり、T 細胞クローンの枯渇を導いている。多相併用療法導入後の免疫回復については個体差があり、免疫再構築制御が新たな課題となっている。

はじめに

HIV の研究領域は、免疫学およびウイルス治療の進展と相まって、アポトーシスと免疫という関連では最も解析の進んだ分野の一つとなっている。HIV 感染がどのようにして個体からの CD4⁺ T 細胞消失をもたしているのかは、後天性免疫不全症候群 (AIDS) の研究の歴史を貫く基幹をなす問いである。しかしながらその理解は格段と進んだものの、現在も未だその解を十分には見いだせていない。本稿では、HIV 感染と T 細胞アポトーシスについて最近の知見を解説し、今後の課題についても言及したい。

HIV は感染細胞の細胞死を誘導する。この誘導するメカニズムは in vitro の研究

HIV は感染細胞の細胞死を誘導する。この誘導するメカニズムは in vitro の研究か? このような基本的な問いに対して、最近 D. Baltimore¹⁾ や E. Verdin²⁾ らのグループより、蛍光色素遺伝子を組み込んだ HIV を標的細胞に感染させ、蛍光色素発現の有無で感染・非感染細胞を識別し、併せて TUNEL 法でアポトーシスを評価する直接的解析の報告がなされた。Baltimore らの観察結果を図 1 にて紹介する。まず図 1 A に示すように、HIV 感染後の生細胞数は T 細胞株 (CEM) を用いた場合はコントロールに比して低下するが、観察期間内では死滅することはない。一方、末梢血 CD4⁺ T 細胞の場合は約 8 日後にはほぼ死滅する。図中矢印で示した時点でそれぞれその細胞を回収し、先述した手法により

* 東京医科歯科大学大学院医学系研究科
感染分子制御学講座 助教授
キーワード: HIV, T 細胞死, 多相併用療法, 活性化誘導細胞死, 免疫再構築

THIS PAGE BLANK (USPTO)